

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月12日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/24790 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/155, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06987

(22) 国際出願日: 2000年10月6日 (06.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/285735 1999年10月6日 (06.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 黒川
清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都
新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 宮田敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENTS FOR RELIEVING CARBONYL STRESS

(54) 発明の名称: カルボニルストレス改善剤

(57) Abstract: Agents for relieving carbonyl stress which comprise biguanides such as metoformin. By administering orally or the like, these agents are usable as drugs directly acting on carboxyl stress *in vivo*.

(57) 要約:

メトホルミン等のビグアナイド剤からなるカルボニルストレス改善剤が提供される。本発明のカルボニルストレス改善剤は、経口投与等により生体内のカルボニルストレスに直接的に作用する薬剤として利用することができる。

WO 01/24790 A1

- 1 -

明細書

カルボニルストレス改善剤

技術分野

本発明は、カルボニルストレスの改善剤に関する。

背景技術

生体内において、カルボニル化合物の非酵素的生化学反応による生成が亢進した状態をカルボニルストレスと呼ぶ。カルボニル化合物は、メイラード反応を通じて老化、糖尿病、あるいは動脈硬化などの成人病との関連性が指摘されている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応である。1912年にメイラード(Maillard)がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した(Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599, 1912)。メイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン(HbA_{1c})が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し(Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296, 1968)、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。たとえば、アマトリ化合物以降の反応で生成するピラリンやペントシジンに代表される後期段階生成物(Advanced glycation end products、以下AGEと省略する)は、老化や糖尿病の指標になりうると考えられている。実際に慢性腎不全の患者においては、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGEが著しく蓄積

- 2 -

している(Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51:1170-1181, 1997、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7:1198-1206, 1996、Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 55:389-399, 1999、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:2349-2356, 1998)。これは腎不全においては、カルボニルストレスが存在しており、糖や脂質に由来するカルボニル化合物がアミノ基とメイラード反応を起こし、タンパク質を修飾するためであると考えられる(Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 55:389-399, (1999))。

したがって、生体内において生成されるカルボニル化合物を除去することによってカルボニルストレス状態を改善することは、腎不全におけるAGEの生成を抑制し、組織障害の軽減につながると考えられる。

更に腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液（グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含有する）は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。そのため腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度は上昇し、カルボニルストレスの状態がもたらされる。その結果、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受けて腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる(Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 58:425-435, 2000、Inagi R., et al., *FEBS Lett.*, 463:260-264, 1999、Ueda, Y., et al., *Kidney Int.* (in press)、Combet, S., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:717-728, 2000)。

実際に腹膜透析患者においては、導入されたグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明された(Yamada, K. et al., *Clin. Nephrol.*, 42: 354-361, 1994、Nakayama, M. et al., *Kidney Int.*, 51: 182-186, 1997、Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 58:425-435, 2000、Inagi R., et al., *FEBS Lett.*, 463:260-264, 1999、Combet, S., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:717-728, 2000)。このように、透析患者においてもカルボニルストレスが腹膜の形態学的変化およびこれに伴う

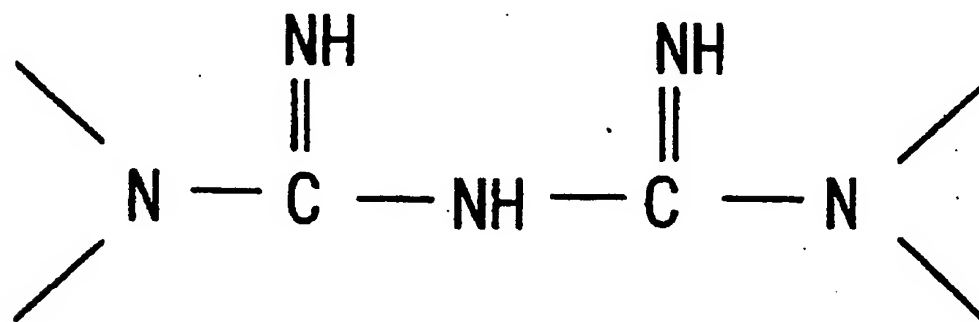
- 3 -

機能（除水能）の低下の原因となっていることが推測されており、その改善方法の提供が求められている。

腹膜透析患者におけるカルボニルストレスの改善方法として、本発明者はアミノグアニジン等のカルボニル化合物トラップ剤の利用について特許出願している（PCT/JP99/04521）。

ところで、グアニジン骨格を持つ化合物として、糖尿病治療薬、殺菌剤、あるいは抗マラリア薬に用いられているピグアナイド剤が公知である。ピグアナイド剤は式（１）に示す基本骨格を有し、反応性に富むイミノ基(=NH)が存在することから、アミノグアニジンと同様にカルボニル化合物の除去作用が期待される。しかし実際には両者の立体構造の相違から、ピグアナイド剤は糖化抑制効果を持たないとされている（「新糖尿病の薬物療法」pp22-31, 3. ピグアナイド剤；田中 逸、メディカル・コア発行(1997年)）。

(1)



発明の開示

本発明は、全身的なカルボニルストレス状態に対しても効果を期待できるカルボニルストレス改善剤の提供を課題としている。

- 4 -

本発明者は、血液中などに蓄積されたカルボニル化合物の低減効果を有する化合物の探索を試みた。先に引用した先行技術にあるように、ビグアナイド剤には糖化の抑制作用が期待できないとされていた。しかし本発明者は、フェンホルミン、メトホルミン、あるいはブホルミンといったビグアナイド剤を用いることにより、媒体中のカルボニル化合物濃度を低減させることができることを明らかにし、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のカルボニルストレス改善剤に関する。

〔１〕ビグアナイド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とするカルボニルストレス改善剤。

〔２〕ビグアナイド剤が、フェンホルミン、メトホルミン、およびブホルミンから構成される群から選択された化合物、またはその薬理学的に許容しうる塩である〔１〕に記載のカルボニルストレス改善剤。

〔３〕ビグアナイド剤を固定化した担体。

〔４〕〔３〕に記載の担体で構成されるカルボニル化合物の吸着剤。

〔５〕〔３〕に記載の担体を患者血液、または腹膜透析液と接触させる工程を含むカルボニル化合物の除去方法。

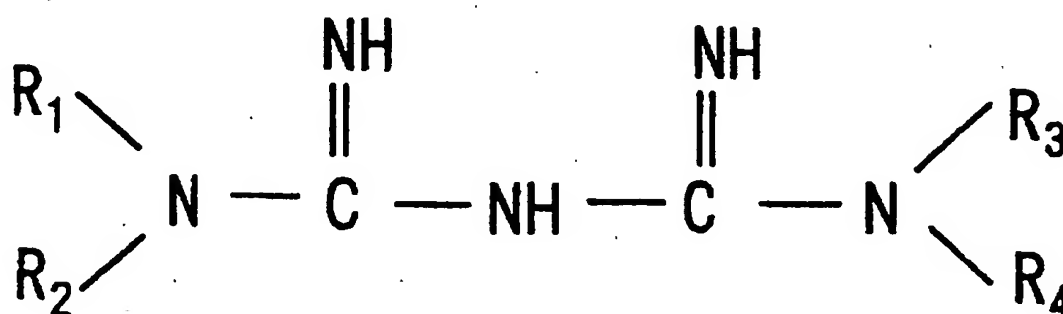
あるいは本発明は、ビグアナイド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩の、カルボニルストレス改善剤の製造における使用に関する。また本発明は、ビグアナイド剤を固定化した担体の、カルボニル化合物の吸着剤の製造における使用に関する。

ビグアナイド剤は、糖尿病の治療薬として用いられているグアニジン骨格を持つ一群の化合物である。経口血糖降下剤として古くから用いられているスルホニル尿素 (Sulfonyl Urea; SU 剤) 剤に代わって、広く用いられるようになっていく。インスリン分泌促進作用は持たず、解糖促進作用を持ち、生体に対して血糖値の低下効果をもたらすことが知られている。しかしながら、カルボニル化合物

との相互作用については何ら報告されておらず、本発明の知見は新規なものである。

本発明におけるヒグアナイド剤とは、たとえば次の一般式（１）で示される構造を持つ化合物を意味する。式中、R₁、R₂、R₃、およびR₄は、H、フェニル基またはアルキル基である。アルキル基としては、フェネチル基、メチル基、あるいはブチル基等を示すことができる。

一般式（１）



上記構造を持つ化合物であって、カルボニルストレスをもたらすカルボニル化合物に作用し、そのタンパク質修飾作用を阻害する化合物が本発明において利用される。

一方本発明において、カルボニルストレスの原因となるカルボニル化合物とは、例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスにともなって蓄積する以下のような化合物が含まれる。

炭水化物に由来するカルボニル化合物：

- ・アラビノース
- ・グリオキサール
- ・メチルグリオキサール

- ・ 3-デオキシグルコゾン

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

- ・ デヒドロアスコルビン酸

脂質に由来するカルボニル化合物：

- ・ ヒドロキシノネナール

- ・ マロンジアルデヒド

- ・ アクロレイン

また、腹膜透析液の滅菌や保存中に、たとえば以下のようなカルボニル化合物が腹膜透析液中に生成することが知られている(Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984))。これらのカルボニル化合物も、透析を通じて患者にカルボニルストレスの状態をもたらしていることが指摘されている。

- ・ 3-デオキシグルコゾン

- ・ 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-hydroxymethylfurfural)

- ・ ホルムアルデヒド

- ・ アセトアルデヒド

- ・ グリオキサール

- ・ メチルグリオキサール

- ・ レブリン酸

- ・ フルフラール

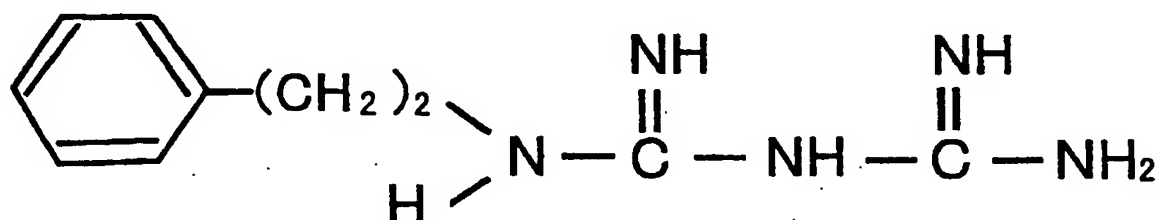
- ・ アラビノース

本発明によるカルボニルストレスの改善剤は、ビグアナイド剤を有効成分として含有する。本発明においてカルボニルストレスの改善とは、生体に接触する媒体中のカルボニル化合物の反応性を奪い、タンパク質の修飾作用を低減する作用を言う。具体的には、例えばカルボニル化合物の吸着や分解、あるいはアミノ基との反応性の低下などの作用が期待できるとき、カルボニルストレスの改善作用があると言えることができる。生体に接触する媒体とは、具体的には腹膜透析液や

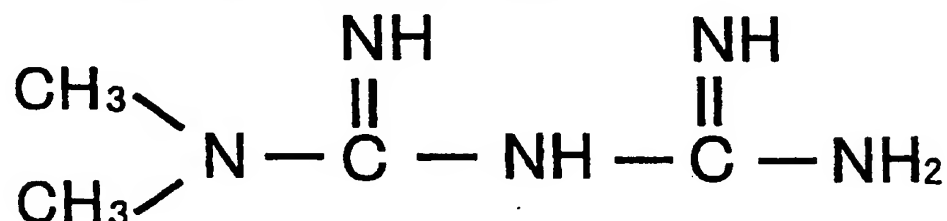
- 7 -

血液他の体液を言う。本発明に利用することができるビグアニド剤として、以下の化合物を示すことができる。これらの化合物は、薬理学的に許容しうる塩であつてもよい。

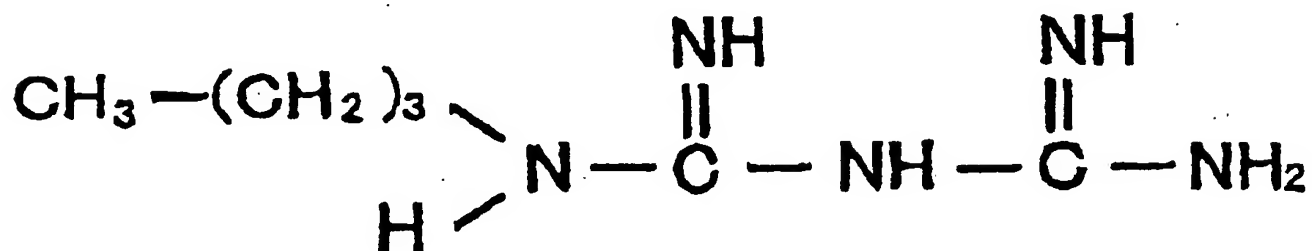
フェンホルミン(Phenformin; Phenethyl biguanide)



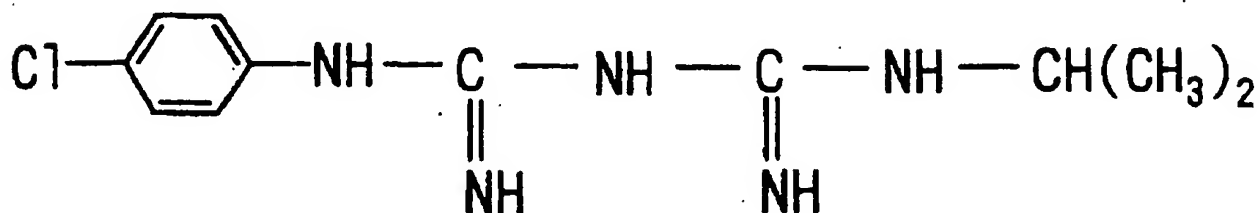
メトホルミン(Metformin; Dimethyl biguanide)



ブホルミン(Buformin; Buthyl biguanide)

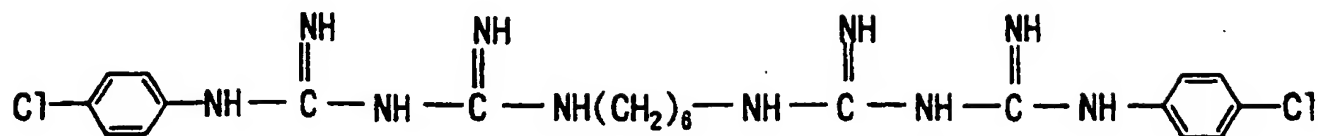


プログアニル(Proguanil)



- 8 -

クロルヘキシジン(Chlorhexidine)



本発明によるカルボニルストレスの改善剤には、例えば以下のような化合物又はそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を組み合わせることができる。なお誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。

(1)メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体（特開昭62-142114号、特開昭62-249908号、特開平1-56614号、特開平1-83059号、特開平2-156号、特開平2-765号、特開平2-42053号、特開平6-9380号、特表平5-505189号）。

(2)スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3)ピラゾロン（特開平6-287179号）、ピラゾリン（特開平10-167965号）、ピラゾール（特開平6-192089号、特開平6-298737号、特開平6-298738号）、イミダゾリジン（特開平5-201993号、特開平6-135968号、特開平7-133264号、特開平10-182460号）、ヒダントイン（特開平6-135968号）などの2個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(4)トリアゾール（特開平6-192089号）などの3個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(5)チアゾリン（特開平10-167965号）、チアゾール（特開平4-9375号、特開平9-59258号）、チアゾリジン（特開平5-201993号、特開平3-261772号、特開平7-133264号、特開平8-157473号）などの1個の窒素原子と1個の硫黄原子を有する5員複素環式化合物。

- (6) オキサゾール (特開平 9-59258 号) などの 1 個の窒素原子と 1 個の酸素原子を有する 5 員複素環式化合物。
- (7) ピリジン (特開平 10-158244 号、特開平 10-175954 号)、
ピリミジン (特表平 7-500811 号) などの含窒素 6 員複素環式化合物。
- (8) インダゾール (特開平 6-287180 号)、ベンゾイミダゾール (特開平 6-305964 号)、キノリン (特開平 3-161441 号) などの含窒素縮合複素環式化合物。
- (9) ベンゾチアゾール (特開平 6-305964 号) などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。
- (10) ベンゾチオフェン (特開平 7-196498 号) などの含硫縮合複素環式化合物。
- (11) ベンゾピラン (特開平 3-204874 号、特開平 4-308586 号) などの含酸素縮合複素環式化合物。
- (12) カルバゾイル (特開平 2-156 号、特開平 2-753 号)、カルバジン酸 (特開平 2-167264 号)、ヒドラジン (特開平 3-148220 号) などの窒素化合物。
- (13) ベンゾキノン (特開平 9-315960 号)、ヒドロキノン (特開平 5-9114 号) などのキノン類。
- (14) 脂肪族ジカルボン酸 (特開平 1-56614 号、特開平 5-310565 号)。
- (15) ケイ素含有化合物 (特開昭 62-249709 号)。
- (16) 有機ゲルマニウム化合物 (特開平 2-62885 号、特開平 5-255130 号、特開平 7-247296 号、特開平 8-59485 号)。
- (17) フラボノイド類 (特開平 3-240725 号、特開平 7-206838 号、特開平 9-241165 号、WO 94/04520)。

- 10 -

- (18)アルキルアミン類（特開平6-206818号、特開平9-59233号、特開平9-40626号、特開平9-124471号）。
- (19)アミノ酸類（特表平4-502611号、特表平7-503713号）。
- (20)アスコクロリン（特開平6-305959号）、安息香酸（WO91/11997）、ピロロナフチリジニウム（特開平10-158265号）などの芳香族化合物。
- (21)ポリペプチド（特表平7-500580号）。
- (22)ピリドキサミンなどのビタミン類（WO97/09981）。
- (23)グルタチオン、システイン、N-アセチルシステインなどのSH基含有化合物。
- (24)還元型アルブミンなどのSH基含有蛋白。
- (25)テトラサイクリン系化合物（特開平6-256280号）。
- (26)キトサン類（特開平9-221427号）。
- (27)タンニン類（特開平9-40519号）。
- (28)第4級アンモニウムイオン含有化合物。
- (29)イオン交換樹脂。
- (30)活性炭、シリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物。

本発明のカルボニルストレス改善剤は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、静脈注射剤、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、貼付剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分であるビグアナイド剤をこのような剤型とする製剤技術は公知である。

- 11 -

たとえば経口投与用の錠剤は、ビグアニド剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮成型することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

本発明によるカルボニルストレスの改善剤を含む錠剤は、マスクングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

また注射剤は、主成分であるビグアニド剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤、塩酸や水酸化ナトリウム等の pH 調整剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

本発明によるカルボニルストレス改善剤は、ビグアニド剤を固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要な応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナ

- 12 -

イト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせることにより、座剤とすることもできる。

本発明のカルボニルストレス改善剤の主成分となるピグアナイド剤は、既に医薬品として利用されている化合物である。したがって、通常安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物に対して、必要量が投与される。投与量は、投与方法（剤型）や投与対象の状態（体格、年齢、性別、症状）に応じて適宜選択される。一般的には、経口投与で通常成人1日用量として体重1 kg 当たり0.001～10 mg、より望ましくは0.01～1 mg とすることにより、カルボニルストレスの改善効果を得ることができる。また投与回数は、たとえば1日1～5回の範囲で適宜選択することができる。なお本発明において、ピグアナイド剤をカルボニルストレスの改善を目的として投与する場合、明らかな毒性は認められない。

本発明のカルボニルストレス改善剤の生体への投与方法として、腹膜透析液への添加を挙げることができる。腹膜透析は腹腔への透析液の注入によって行われるので、このとき腹膜透析液中に予め本発明のカルボニルストレス改善剤を添加しておけば良いのである。腹膜透析液中に浸出するカルボニル化合物がピグアナイド剤と反応して無害化され、結果的にカルボニルストレス状態が改善される。また、予め透析液中に添加されたピグアナイド剤は、透析液の高圧蒸気滅菌等の処理等に伴って製造段階や保存中に生成するカルボニル化合物を予防的に無害化する作用も期待できる。本発明に基づいて腹膜透析液にピグアナイド剤を添加する場合には、たとえば0.5～100 mM、通常1～50 mM、好ましくは5～20 mM となるように添加する。

本発明におけるカルボニルストレスの改善剤は、生体への投与の他、生体外における血液や透析液等との接触を通じてカルボニルストレスを改善する方法に適用することもできる。このような利用形態においては、ヒグアナイド剤を担体に固定化して用いるのが有利である。

本発明におけるヒグアナイド剤を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、血液や透析液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限はなく、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系ポリマー系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などがあげられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせ使用され得る。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にヒグアナイド剤が固定化される。固定化されるヒグアナイド剤は、単独で固定化するほか、2種類以上を固定化してもよい。

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などがあげられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、血液や透析液との接触面積を制御することができる。

上記担体にヒグアナイド剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とヒグアナイド剤の間に導入してもよい。両者を共有結合によって結合すれば、ヒグアナイド剤の溶出量をできるだけ少なくすることができるので好ましい。ヒグアナイド剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

本発明のヒグアナイド剤を固定化した担体は、公知の方法によって滅菌することができる。具体的には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。

ヒグアナイド剤を固定化した担体と血液との接触には、種々の形態が考えられる。例えば、ヒグアナイド剤を固定化した担体が充填された血液バッグに採血した患者の血液を入れ、この中で患者血液のカルボニル化合物をトラップする方法、ヒグアナイド剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填してカートリッジとし、これに血液を循環させる方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくても、血漿を分離したのち、血漿を処理してもよい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。

血液バッグ内にビグアニド剤を固定化した担体を含めておくことにより、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップすることも可能である。

本発明のビグアニド剤を固定化した担体と血液との接触は、血液透析や血液濾過、血液濾過透析、血液吸着、血漿分離を含む血液浄化の過程で行うことができる。

例えば、血液透析患者に対しては、血液透析回路内にビグアニド剤を固定化した担体を配置させることにより、血液透析とカルボニル化合物のトラップとを同時に行うことができる。この場合、ビグアニド剤を血液透析膜に固定化しておくことが好ましい。担体として用いられる透析膜の種類は公知のものを使用することができる。例えば、再生セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース誘導体、ポリメチルメタクリレート、ポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルナイロン、シリコン、ポリエステル系共重合体等が挙げられ、特に限定されない。もちろん透析膜を担体とせず、上記のように、ビグアニド剤を固定化した担体を充填したカラムを血液透析回路中に配置させてもよい。このように患者血液をビグアニド剤を固定化した担体に接触させることにより、血中由来のカルボニル化合物が捕捉され、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。体外循環時に血液の凝固を防ぐため、抗凝固剤を併用することもできる。抗凝固剤としては、例えば、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン（メシル酸ナファモスタット）等が挙げられる。これらは、担体に固定化されていてもよい。

血液との接触の他、腹膜透析液を固定化したビグアニド剤と接触させる方法も、カルボニルストレス状態の改善においては有効である。たとえば腹膜透析においては、ビグアニド剤を内部に固定化した容器、あるいは粒子や繊維のような担体に固定したビグアニド剤入りの容器に腹膜透析液を収容し、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップさせることができる。後者においては、不溶性担体をろ過などによって腹膜透析液から分離することができる。またビグ

- 16 -

アナイド剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填してカルボニル化合物トラップ用カートリッジとし、このカートリッジに腹膜透析液を接触させた後に腹腔内に導入することもできる。腹腔導入時にカルボニル化合物トラップ用カートリッジに接触させる場合、透析中に蓄積する患者由来のカルボニル化合物を除去することはできないが、透析液中のカルボニル化合物の除去は可能である。あるいは腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、循環回路中にビグアナイド剤を固定化した前記カルボニル化合物トラップ用カートリッジを設置することにより、腹膜透析液のみならず、透析中に腹腔内に蓄積するカルボニル化合物の除去をも達成することができる。

血液や透析液との接触時に用いるビグアナイド剤が少ないと、透析時に患者血中の一部のカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者血中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のビグアナイド剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。ビグアナイド剤の用量は、担体へのビグアナイド剤の固定化量、またはビグアナイド剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。

本発明のカルボニルストレス改善剤の効果は、血中のカルボニル化合物濃度や AGE 濃度を追跡することにより確認することができる。生体内における効果を見るには、本発明によるカルボニルストレス改善剤を投与した群と、対照の間で、血中の AGE 濃度を比較する。対照には、無処理群、あるいはこの改善剤から主剤であるビグアナイド剤のみを除いた対照薬剤や生理食塩水を投与した群を置くと良い。カルボニル化合物としては、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)、および 3-デオキシグルコソン(3DG)等を指標とすることができる。これらのカルボニル化合物は、実施例に示すように HPLC 等を用いて容易に測定することができる (Ohmori S. et al. J.Chromatogr.414:149-155,1987. Yamada H.,

- 17 -

J. Biol. Chem. 269:20275-20280, 1994)。あるいは、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)を酸性下でカルボニル化合物と反応させ、生成する発色生成物を 360nm における吸光度で測定することもできる。また AGE としては、ペントシジン等を指標として利用することができる。ペントシジンの逆相 HPLC による定量方法は公知である(Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 7: 1198-1206, 1996)。

ヒグアナイド剤は、経口的に投与した場合、一般に投与後 1～2 時間において最大血中濃度を維持する(N. Engl. J. Med. 334:574-579, 1996)。したがって、この間のペントシジン濃度の推移を観察することにより、改善剤の効果を確認できる。対照に対するペントシジン濃度の低下によって、改善剤の効果を確認することができる。他方、生体外における本発明のカルボニルストレス改善剤の作用を確認するには、血液や透析液中におけるカルボニル化合物や AGE の濃度を確認すれば良い。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒグアナイド剤（メトホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 2 は、ヒグアナイド剤（ブホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 3 は、ヒグアナイド剤（フェンホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 4 は、ヒグアナイド剤を加えない場合（対照）のカルボニル化合物の濃度変化を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図5は、ヒグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（グリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析液中のグリオキサールの残存率（％）を、横軸はヒグアナイド剤の種類を示す。

図6は、ヒグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（メチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析中のメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はヒグアナイド剤の種類を示す。

図7は、ヒグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（3-デオキシグルコソン）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析中の3-デオキシグルコソンの残存率（％）を、横軸はヒグアナイド剤の種類を示す。

図8は、ヒグアナイド剤による腹膜透析排液中のジカルボニル化合物（グリオキサールおよびメチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析排液中のグリオキサールおよびメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はヒグアナイド剤の種類およびその濃度を示す。

図9は、ヒグアナイド剤による血清中のジカルボニル化合物（グリオキサールおよびメチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は血清中のグリオキサールおよびメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はヒグアナイド剤の種類およびその濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕 ヒグアナイド剤のカルボニル化合物トラップ効果

代表的なカルボニル化合物である、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)、および3-デオキシグルコソン(3DG)の混合溶液(各 1 mM)100 μ l、0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)800 μ l、30mMのヒグアナイド剤溶液 100 μ lを混合し、37°Cでインキュベートした。ヒグアナイド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。インキュベート終了後、溶液中のグリオキ

サール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。すなわち、インキュベート終了後のサンプル 100 μ l に 2M 過塩素酸 40 μ l、1% o-フェニレンジアミン 40 μ l、50 μ M 2,3-ブタンジオン 100 μ l を加えて攪拌後、25°C で 1 時間反応させた。ジカルボニル化合物と o-フェニレンジアミンとの反応で生成するキノキサリン誘導体を逆相カラムを用いた HPLC により Ohmori らの方法(Ohmori S. et al. J.Chromatogr.414:149-155,1987.)により測定した。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサール、および 3-デオキシグルコソンを用いた。

結果を図 1 (メトホルミン)、図 2 (ブホルミン)、および図 3 (フェンホルミン) に示した。カルボニル化合物のみではインキュベーション時間の間に測定値の変動はほとんど観察されない(図 4; control)。一方、ヒグアナイド剤を加えた場合には、いずれの化合物においてもインキュベーション時間に応じてグリオキサールとメチルグリオキサールの濃度が顕著に低下し、ヒグアナイド剤によるカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。すなわち、ヒグアナイド剤がカルボニル化合物と反応してその反応性を失うことが確認された。

[実施例 2] ヒグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニルのトラップ作用

腹膜透析液中には高圧蒸気滅菌や保存中に生成したカルボニル化合物が存在している。従って、予め腹膜透析液中にヒグアナイド剤を添加することによって、製造段階や保存中に生成するカルボニル化合物を予防的に無害化できる。あるいは、腹膜透析液をヒグアナイド剤が固定化された担体と接触させることによって、当該カルボニル化合物を除去できる。

まず、市販の腹膜透析液(バクスター株式会社製、ダイアニール-登録商標-PD-4 1.5)中に存在する各種カルボニル化合物の量を Ohmori らの方法(Ohmori S. et al., J. Chromatogr., 414:149-155, 1987)を用いて測定した。

- 20 -

その結果、腹膜透析液中のグリオキサール濃度は $11 \mu\text{M}$ 、メチルグリオキサール濃度は $3.5 \mu\text{M}$ 、3-デオキシグルコソン濃度は $42 \mu\text{M}$ であった。

次に、この腹膜透析液（バクスター株式会社製、ダイアニール -登録商標- PD-4 1.5） $900 \mu\text{L}$ に、ヒグアナイド剤を 0.1M リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）に溶解した溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加してサンプル溶液とした。ヒグアナイド剤は、終濃度が 0 、 1 、 5 、 10mM となるように加えた。ヒグアナイド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。混合後のサンプル溶液を 37°C で 4 時間インキュベートした。

インキュベート終了後、サンプル溶液に残存するグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。すなわち、インキュベート終了後のサンプル $100 \mu\text{l}$ に 2M 過塩素酸 $40 \mu\text{l}$ 、 1% o-フェニレンジアミン $40 \mu\text{l}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 2,3-ブタンジオン $100 \mu\text{l}$ を加えて攪拌後、 25°C で 1 時間反応させた。ジカルボニル化合物と o-フェニレンジアミンとの反応で生成するキノキサリン誘導体を、逆相カラムを用いた HPLC により Ohmori らの方法（Ohmori S. et al. J. Chromatogr. 414:149-155, 1987）により測定した。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを用いた。

結果を図 5（グリオキサール）、図 6（メチルグリオキサール）、図 7（3-デオキシグルコソン）に示した。各カルボニル化合物の量は、ヒグアナイド剤の存在しない場合を 100% としたときの残存率（%）で表される。ヒグアナイド剤の存在下では、ヒグアナイド剤の濃度に依存してグリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、腹膜透析液においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

〔実施例 3〕 ヒグアナイド剤による腹膜透析液排液中のジカルボニルのトラップ作用

- 2 1 -

腹膜透析においては、反応性の高いカルボニル化合物が、血中老廃物とともに、腹膜を介して患者腹腔中の腹膜透析液に蓄積されている。そこで、ビグアニド剤による、腹膜透析施行時における腹腔中の腹膜透析液中のカルボニル化合物のトラップ作用を検討する目的で、腹膜透析患者の腹腔中から排出された腹膜透析排液中のジカルボニル化合物に対するビグアニド剤のトラップ効果を実験した。

まず、市販の腹膜透析液（バクスター株式会社製、ダイアニール -登録商標- PD-4 1.5）を投与されている腹膜透析患者の腹膜透析排液（腹腔内に2時間貯留した液）900 μ l、ビグアニド剤を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶かした液100 μ lを添加し、混合後のビグアニドの濃度が0、5、25、50mMの溶液となるようにし、37°Cで4時間インキュベートした。ビグアニド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。インキュベート終了後のサンプル200 μ lに水200 μ l、2M過塩素酸100 μ lを加え遠心後、0.45 μ mのフィルターで濾過した。濾液150 μ lに10 μ M 2,3-ブタンジオン50 μ l、1% 0-フェニレンジアミン20 μ lを加えて攪拌後、室温で2時間反応させた。つぎに、5N水酸化ナトリウム水溶液40 μ lを加えて攪拌後トルエン600 μ l加えて抽出した。さらに、トルエン相500 μ lに2M過塩素酸を加え、攪拌しキノキサリン誘導体を抽出した。Ohmoriらの方法(Ohmori S. et al. J. Chromatogr. 414 :149-155, 1987)により水相を逆相カラムを用いたHPLCにより分析し、グリオキサール、メチルグリオキサールの定量を行った。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサールを用いた。

結果を図8に示した。各カルボニル化合物の量はビグアニド剤が存在しない場合を100%としたときの残存率(%)で表される。ビグアニド剤の存在下では、ビグアニド剤の濃度に依存してグリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、腹膜透析液排液においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

〔実施例 4〕 ビグアニド剤による血清中のジカルボニルのトラップ作用

本発明のカルボニルストレス改善剤を血液透析施行患者に適用した場合の効果を確認する目的で、ビグアニド剤による血清中のジカルボニル化合物のトラップ作用を実験した。

まず、血液透析を受けている患者の血清 900 μ l、ビグアニド剤を 0.1M リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶かした液 100 μ l を添加し、混合後のビグアニドの濃度が 0、5、25、50 mM の溶液となるようにし、37℃で4時間インキュベートした。ビグアニド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。グリオキサール、メチルグリオキサールの定量については、実施例 3 の場合と同様の方法で行った。

結果を図 9 に示した。各カルボニル化合物の量はビグアニド剤が存在しない場合を 100%としたときの残存率(%)で表される。ビグアニド剤の存在下では、グリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、血清中においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、生体外のみならず、生体内でのカルボニル化合物除去作用を期待できるカルボニルストレス改善剤を提供することができる。本発明のカルボニルストレス改善剤を構成するビグアニド剤は、既に経口血糖降下剤として臨床応用されている薬剤である。したがって、経口投与などの形で投与することができ、生体内のカルボニルストレスに対して直接的に作用する薬剤として利用することができる。また既に高度な製剤技術が確立されており、容易に供給することができる。

- 23 -

請求の範囲

1. ビグアニド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とするカルボニルストレス改善剤。
2. ビグアニド剤が、フェンホルミン、メトホルミン、およびブホルミンから構成される群から選択された化合物、またはその薬理学的に許容しうる塩である請求項 1 に記載のカルボニルストレス改善剤。
3. ビグアニド剤を固定化した担体。
4. 請求項 3 に記載の担体で構成されるカルボニル化合物の吸着剤。
5. 請求項 3 に記載の担体を患者血液、または腹膜透析液と接触させる工程を含むカルボニル化合物の除去方法。

図 1

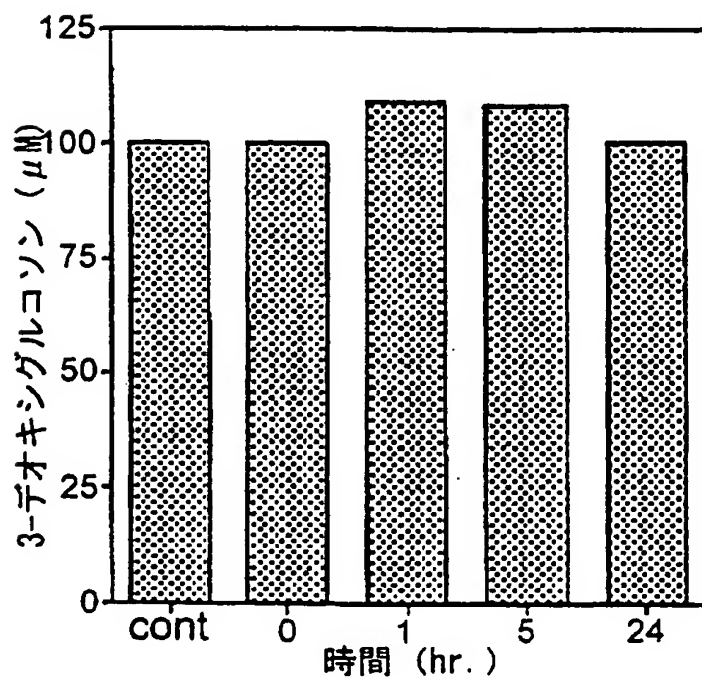
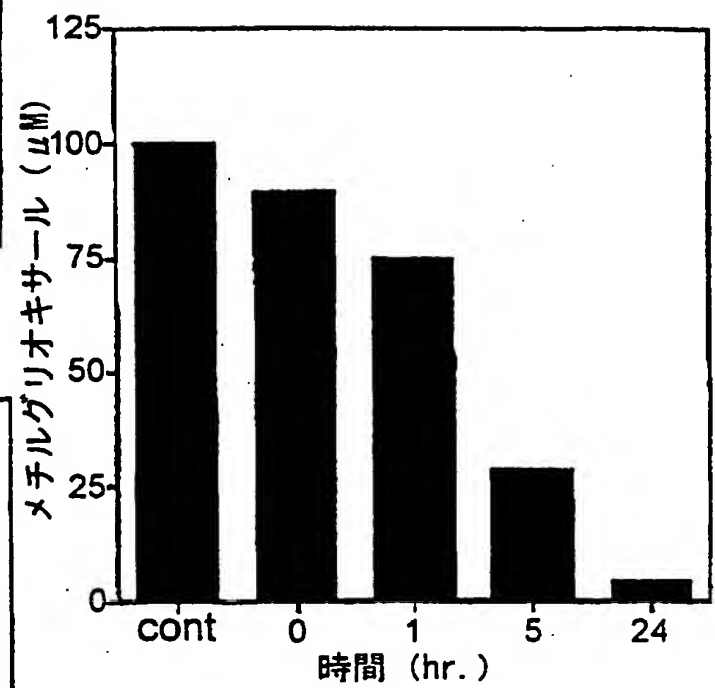
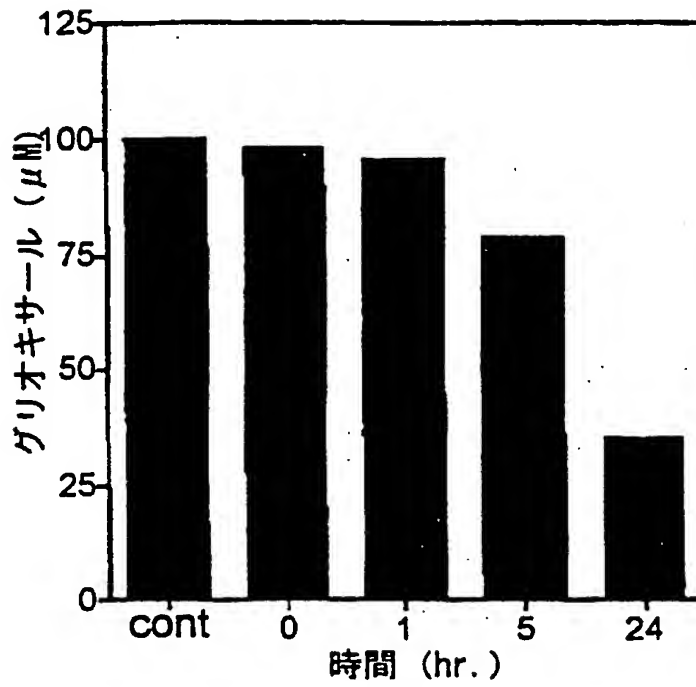


図 2

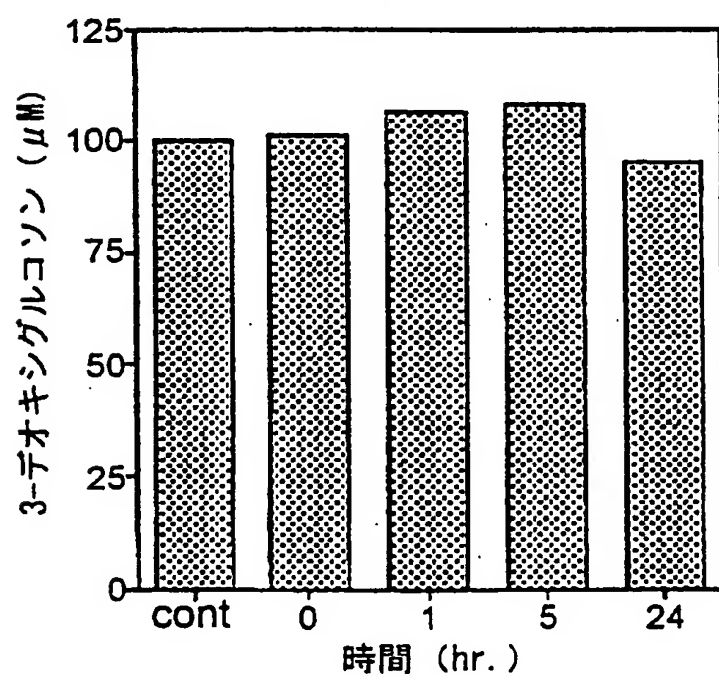
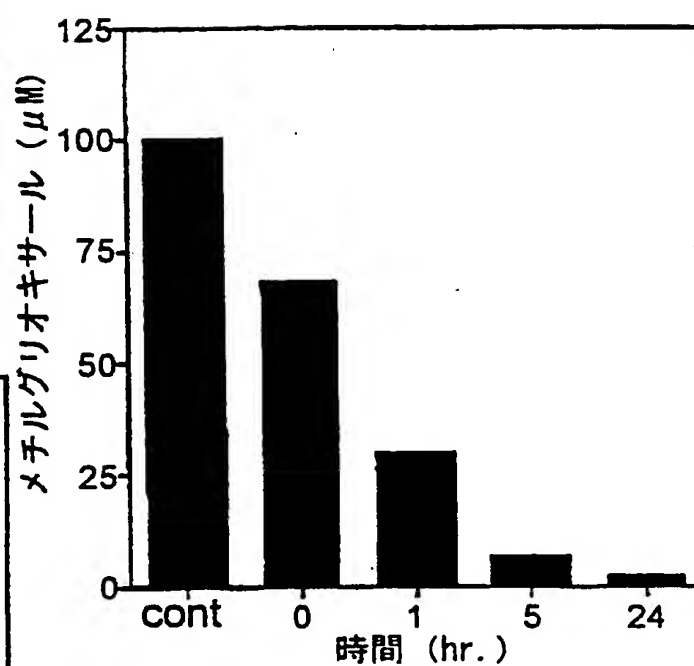
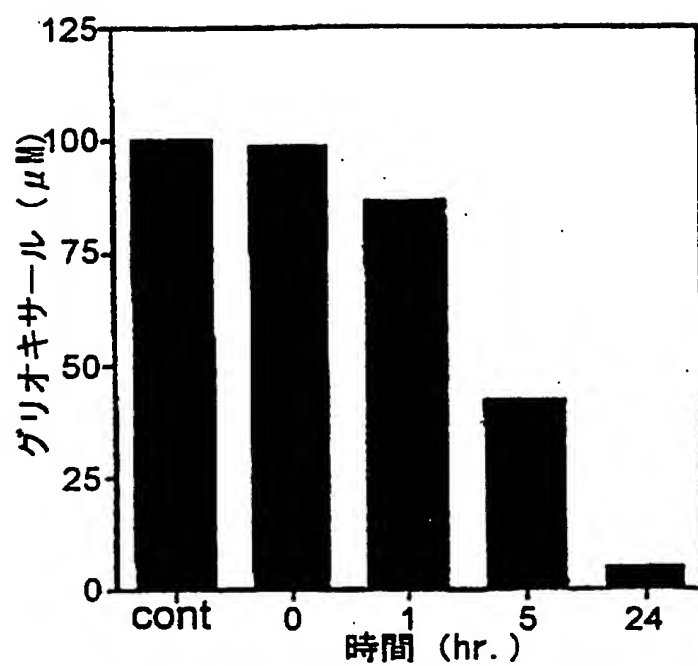


図 3

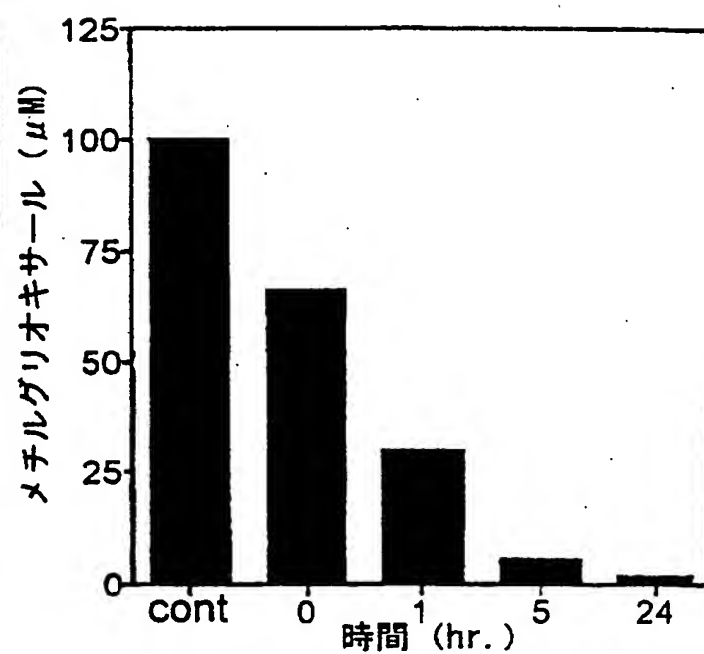
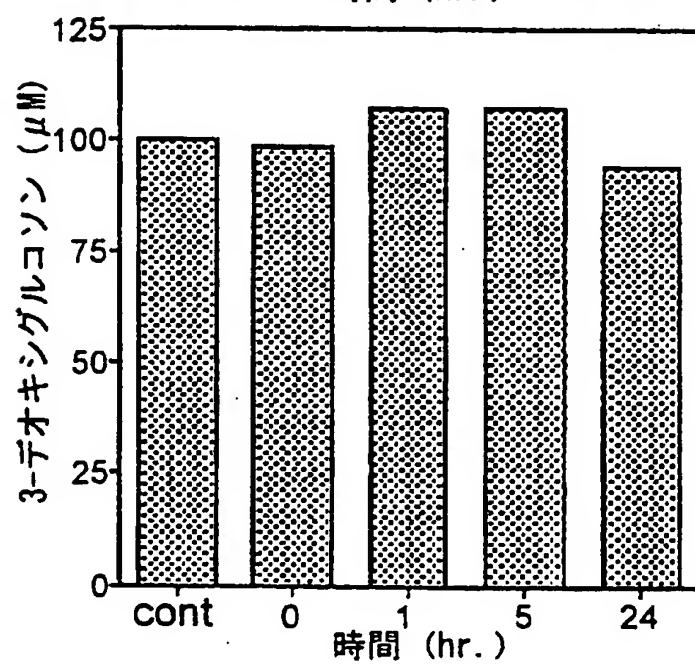
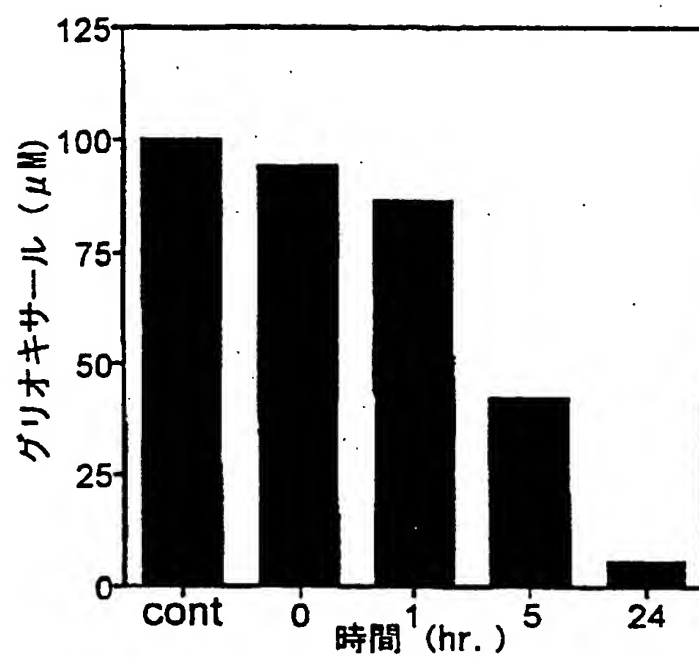


図 4

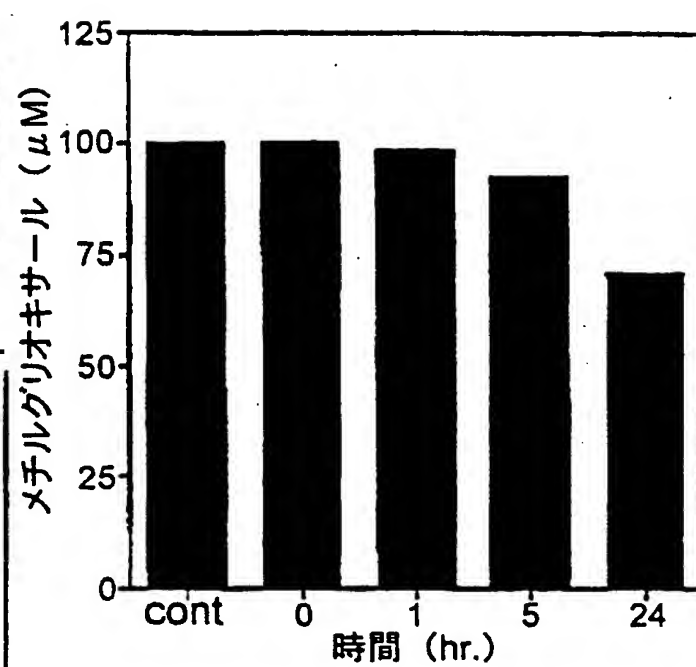
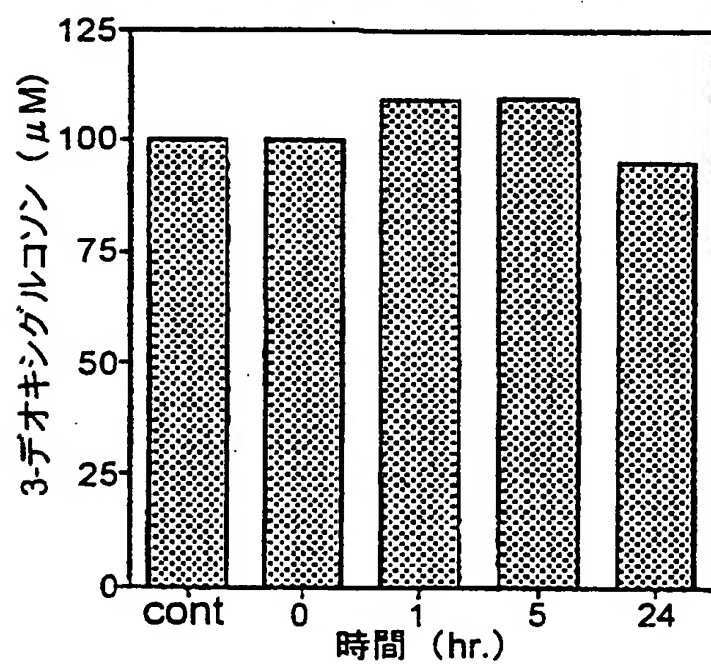
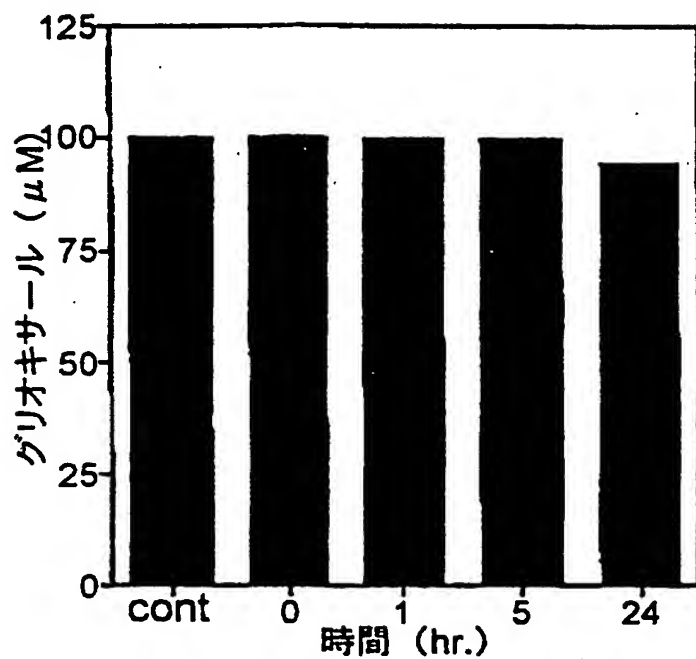


図 5

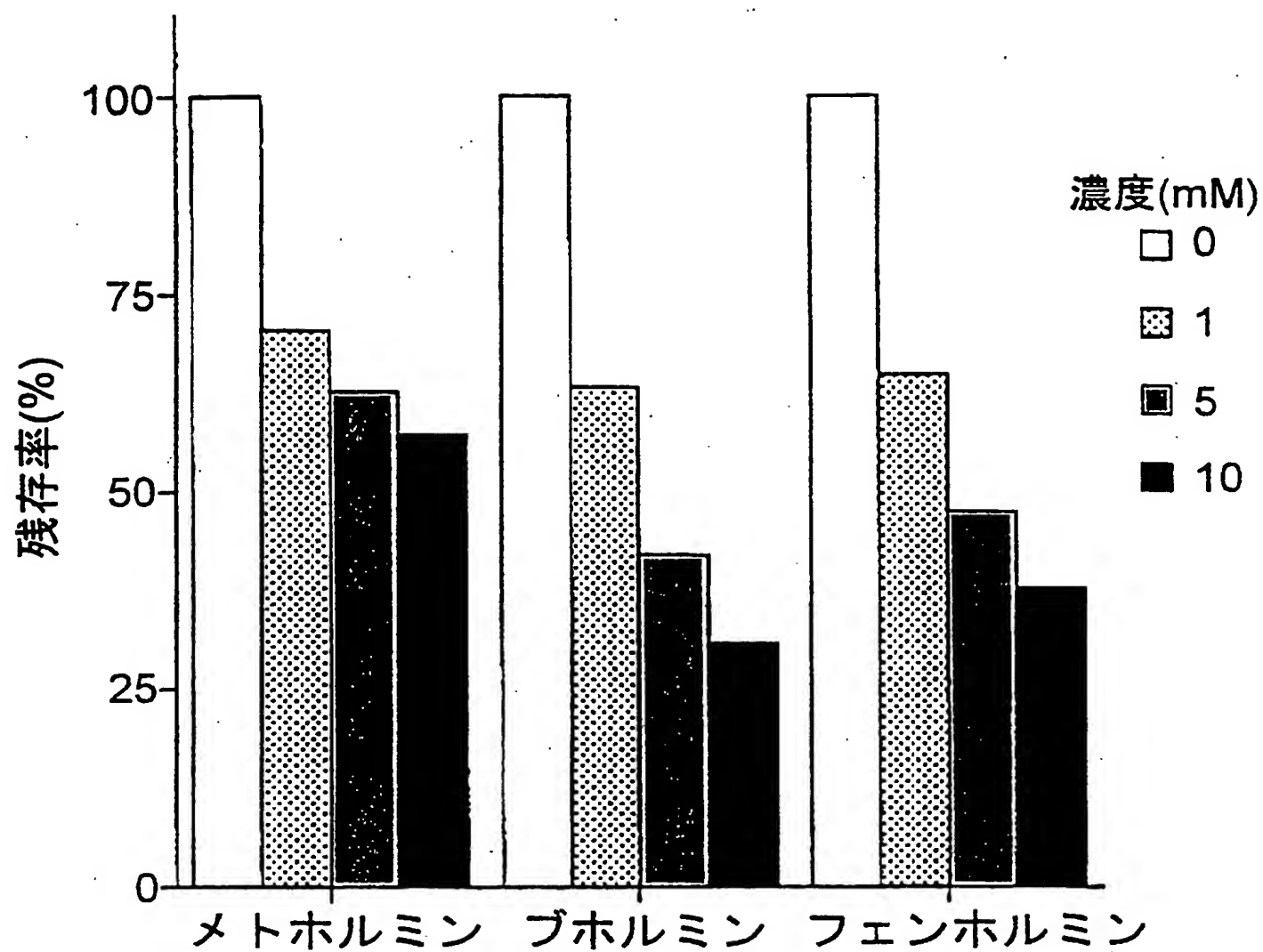
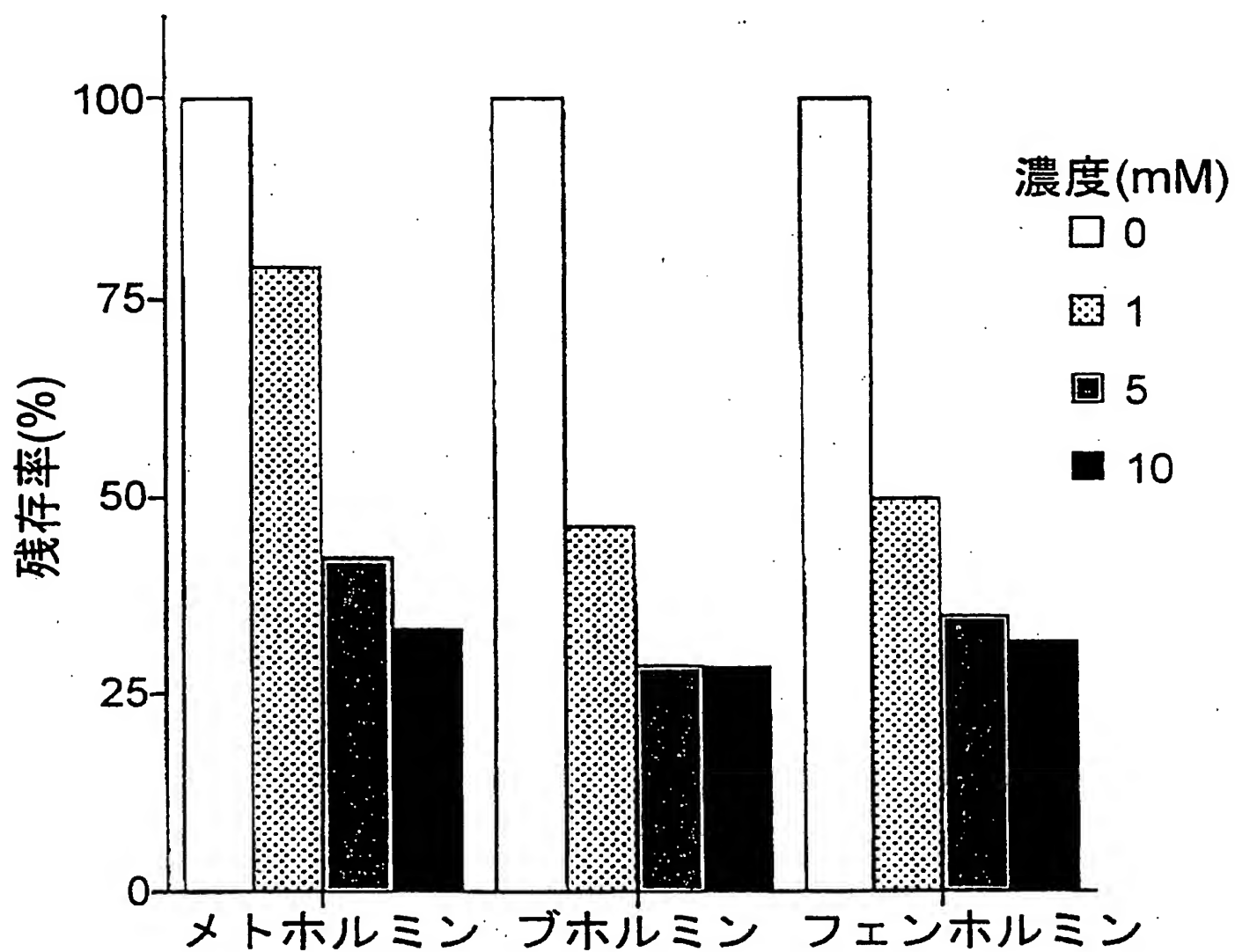


図 6



7/9

図 7

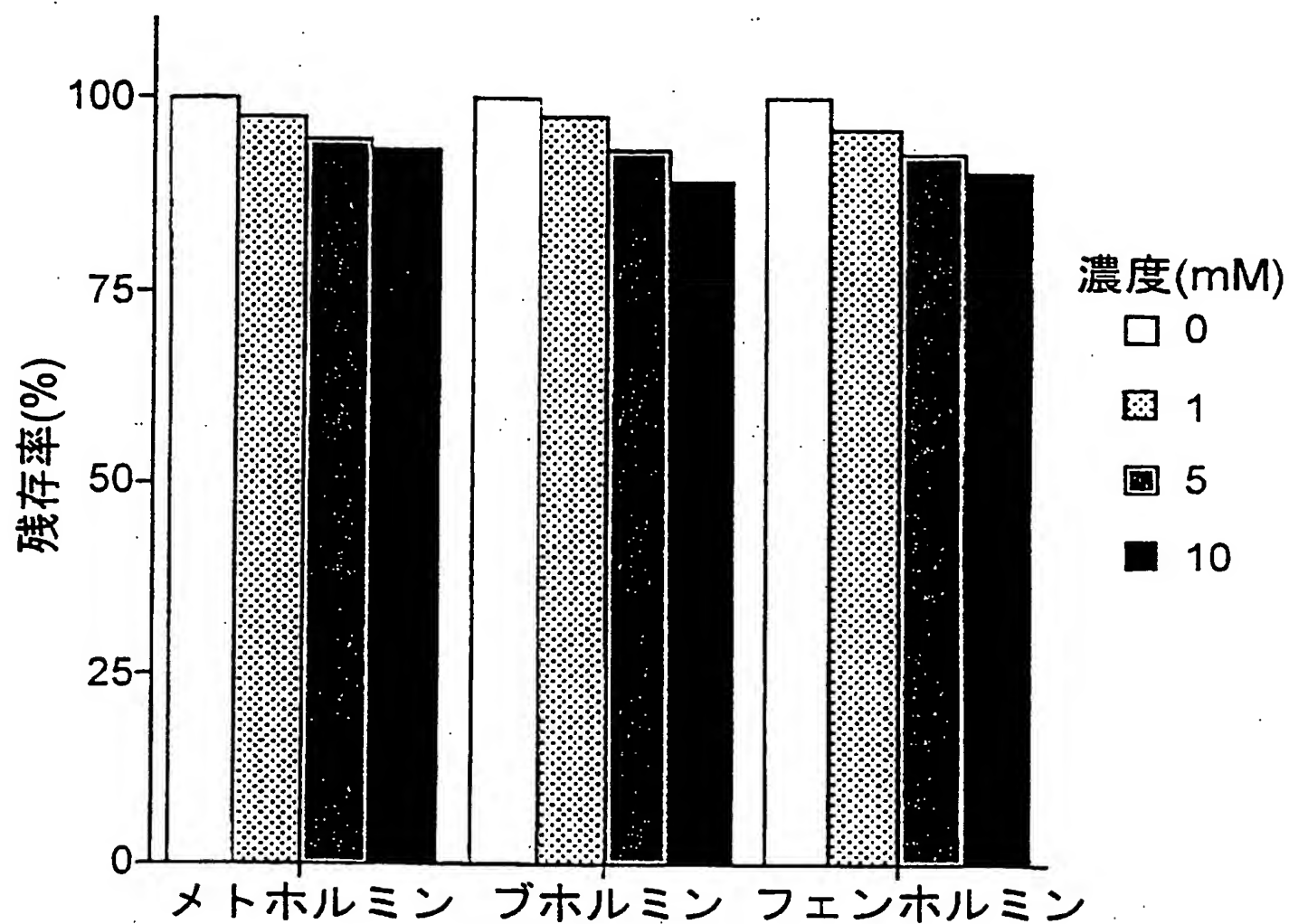
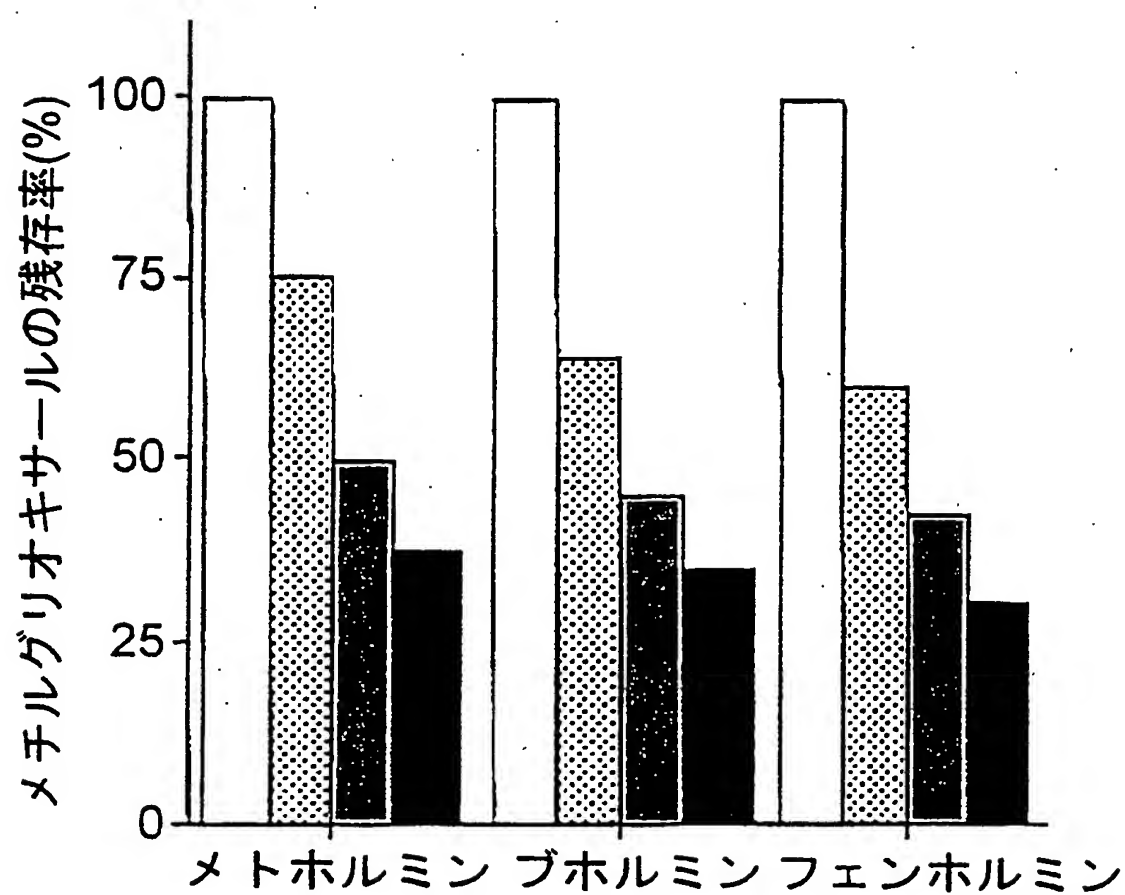
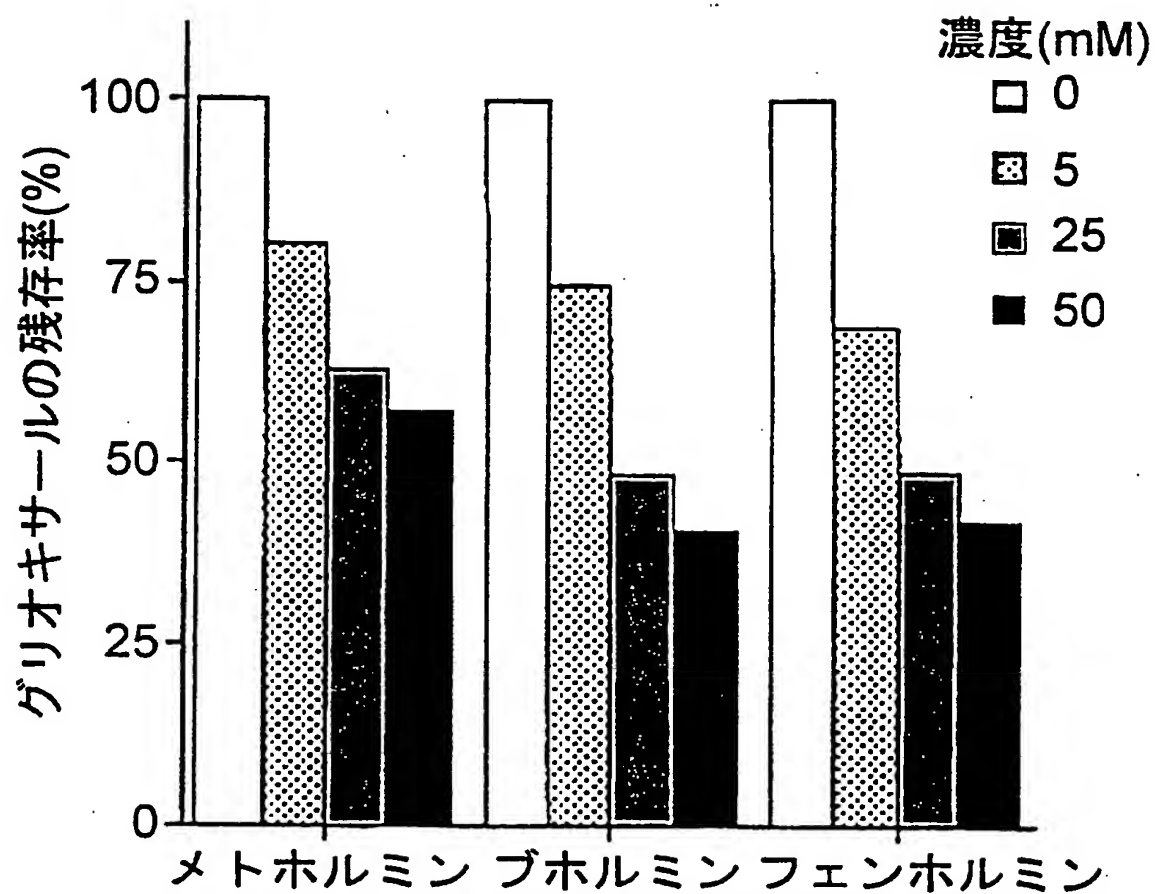
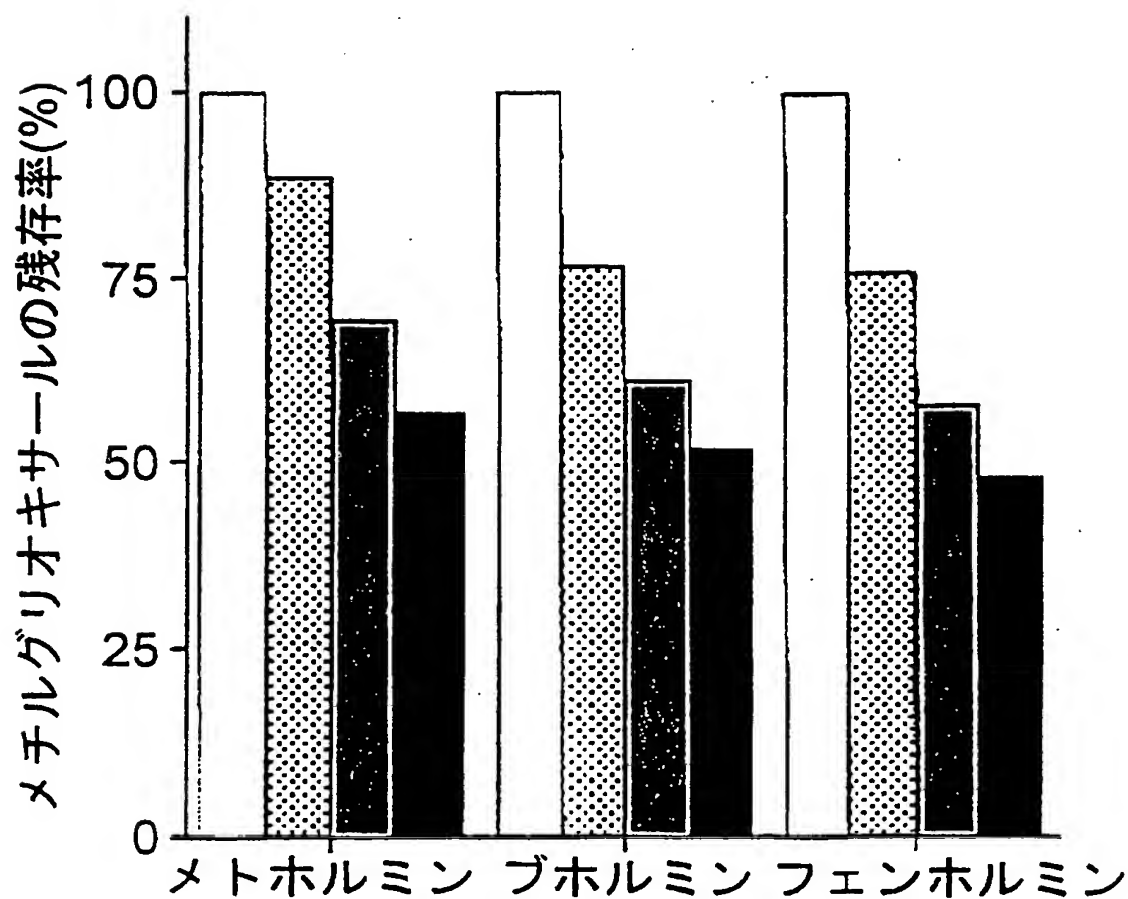
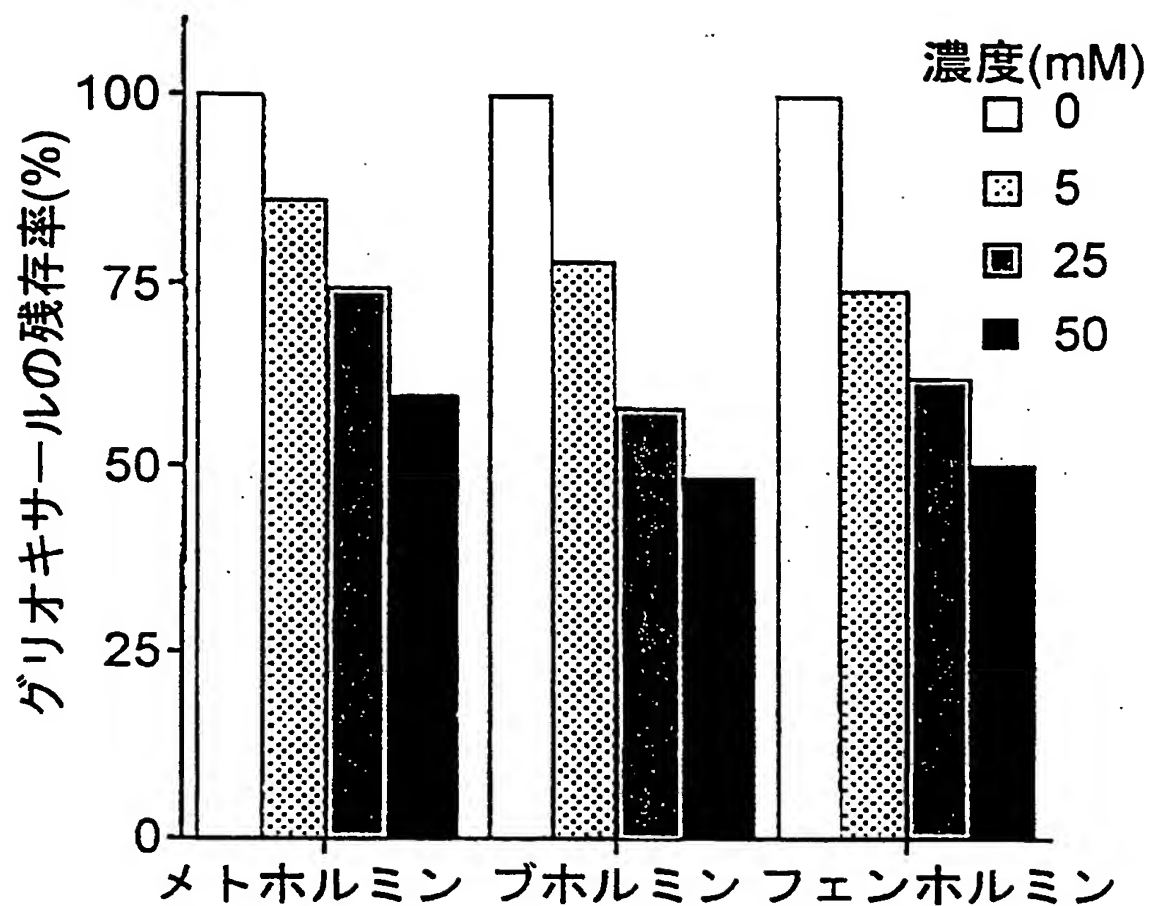


図 8



9 / 9

図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL.58, NO.10 (1997) pp.693-697	1, 2
Y	YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," GENDAI IGAKU, VOL.45, NO.2 (1997) pp.363-368	1, 2
X	G.T.LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES," MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL.24, NO.2 (1987) pp.133-141	3
PX	WO, 00/10606, A1 (MIYATA TOSHIO), 02 March, 2000 (02.03.00) (Family: none)	1, 2
PX	DANIEL RUGGIERO-LOPEZ et al., "REACTION OF METFORMIN WITH DICARBONYL COMPOUNDS.POSSIBLE IMPLICATION IN THE INHIBITION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCT FORMATION," BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, VOL.58, NO.11 (1999)	1, 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 December, 2000 (15.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	pp.1766-1773 US, 4028402, A (Hoffmann-La Roche Inc.), 07 July, 1977 (07.07.77) & DE, 2542598, A & FR, 2287221, A & GB, 1473256, A & JP, 52-83906, A	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The present application involves the following two groups of inventions.
Claims 1 and 2: inventions relating to agents for relieving carbonyl stress which comprise biguanides as the active ingredient.

Claims 3 to 5: inventions relating to carriers having biguanides fixed thereon, use thereof and methods of using the same.

Although the inventions of claims 1 and 2 and the inventions of claims 3 to 5 have only one matter in common, i.e., biguanides, biguanides had been publicly known. Accordingly, the two groups of inventions cannot be recognized as being in a relationship of having in common a special technical feature exceeding the prior art. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/155, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/155, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL. 58, NO. 10(1997) pp. 693-697	1, 2
Y	YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," GENDAI IGAKU, VOL. 45, NO. 2(1997) pp. 363-368	1, 2
X	G. T. LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR	3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15. 12. 00	国際調査報告の発送日 26.12.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 今 村 玲 英 子 印	4 C 8 5 1 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES," MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL. 24, NO. 2 (1987) pp. 133-141	
P X	WO, 00/10606, A1 (MIYATA TOSHIO) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) (ファミリーなし)	1, 2
P X	DANIEL RUGGIERO-LOPEZ et al. "REACTION OF METFORMIN WITH DICARBONYL COMPOUNDS. POSSIBLE IMPLICATION IN THE INHIBITION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCT FORMATION," BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, VOL. 58, NO. 11(1999) pp. 1766-1773	1, 2
A	US, 4028402, A (Hoffmann-La Roche Inc.,) 7. 7月. 1977 (07. 07. 77) & DE, 2542598, A & FR, 2287221, A & GB, 1473256, A & JP, 52-83906, A	1-5

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

この出願には、以下の2つの発明が含まれている。

請求項1-2: ビグアニド剤を有効成分とするカルボニルストレス改善剤に関する発明

請求項3-5: ビグアニド剤を固定化した担体、その用途、その使用方法に関する発明

請求項1-2の発明と請求項3-5の発明とは、ビグアニド剤のみを共通にしているが、ビグアニド剤は公知物であるから、上記2つの発明は先行技術を越える特別の技術的特徴を共有する関係にあるとは認められず、したがって単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。